

UNTERSUCHUNGEN ZUR HÄUFIGKEIT DES
PLASMIDVERLUSTES BEI PENICILLINASEBILDENDEN
GONOKOKKENSTÄMMEN BEI WIEDERHOLTER
PASSAGIERUNG IN GEGENWART VON CEFTIZOXIM
SOWIE IN ABWESENHEIT JEDLICHER ANTIBIOTIKA
UND SEINER BEDEUTUNG FÜR DIE
ANTIBIOTIKAEMPFINDLICHKEIT

GERD UNGLAUB

1988 *Z*

Disbui. München

1987



AUS DER DERMATOLOGISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
VORSTAND PROF. DR. OTTO BRAUN-FALCO

UNTERSUCHUNGEN ZUR HÄUFIGKEIT DES PLASMIDVERLUSTES
BEI PENICILLINASEBILDENDEN GONOKOKKENSTÄMMEN BEI
WIEDERHOLTER PASSAGIERUNG IN GEGENWART VON CEFTIZOXIM
SOWIE IN ABWESENHEIT JEDLICHER ANTIBIOTIKA UND SEINER
BEDEUTUNG FÜR DIE ANTIBIOTIKAEMPFINDLICHKEIT

DISSERTATION
ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER ZAHNHEILKUNDE
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
GERD UNGLAUB
AUS
NEUKIRCHEN BEI HL. BLUT

JAHR
1986

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

BERICHTERSTATTER:

PRIV.DOZ.DR.H.C.KORT

MITBERICHTERSTATTER:

PROF.DR.O.BRAUN-FALCO

DEKAN:

PROF.DR.DR.h.c. W.SPAN

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 27.10.1987

GEWIDMET MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung.....	1
2. Material.....	3
2.1. Herstellung der Agarplatten.....	3
2.2. Herstellung der Platten für den Zucker- vergärungstest.....	3
2.3. Herstellung der Bouillon zur Anzüchtung und Passagierung von Gonokokken im flüs- sigen Medium.....	4
2.4. Einfriermedium.....	4
2.5. Bakterienstämme.....	5
2.6. Antibiotika.....	6
3. Methoden.....	7
3.1. Vorversuche.....	7
3.1.1. Empfindlichkeitsbestimmung mittels des Agar-Dilutionstests.....	7
3.1.2. Empfindlichkeitsbestimmung mittels des Bouillonverdünnungstests.....	8
3.1.3. Zuckervergärungstest.....	8
3.1.4. Nitrocefintest, Oxydasetest, Gram-Färbung...	9
3.1.5. Keimzahlbestimmung.....	10
3.2. Hauptversuch: Versuch zur Häufigkeit des Plasmidverlustes im flüssigen Medium.....	11
3.2.1. Versuchsansatz und Herstellung der Gono- kokkenausgangssuspension.....	11
3.2.2. Vorbereitung der benötigten Antibiotika- lösungen.....	12
3.2.3. Tägliches Subkultivieren und Prüfung der β-laktamasebildung.....	12
3.2.4. Empfindlichkeitsbestimmung mittels des Agar-Dilutionstests nach Abschluß des Versuchs.....	13
3.2.5. Abschließende Prüfung der Plasmidver- luste.....	13
3.2.6. Identifizierung der β-laktamasenegativen Varianten.....	14

	Seite
4.	Ergebnisse..... 15
4.1.	Ergebnisse der Vorversuche..... 15
4.1.1.	Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung mittels des Agar-Dilutionstests..... 15
4.1.2.	Ergebnisse der Empfindlichkeitsbestimmung mittels des Bouillon-Verdünnungstests... 16
4.1.3.	Ergebnisse des Zuckervergärungstests.... 17
4.1.4.	Ergebnisse des Nitrocefin-und Oxydase- tests sowie der Gram-Färbungen..... 17
4.1.5.	Ergebnis der Keimzahlbestimmung..... 18
4.2.	Ergebnisse der Hauptversuche..... 19
4.2.1.	Häufigkeit der Plasmidverluste..... 19
4.2.2.	Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels des Agar-Dilutionstests nach Abschluß der Hauptversuche..... 21
4.2.2.1.	Minimale Hemmkonzentrationswerte für die eingesetzten β -laktamasebildenden Gono- kokkenstämme..... 21
4.2.2.2.	Minimale Hemmkonzentrationswerte für die eingesetzten WHO-Stämme III,V und VII... 21
4.2.2.3.	Minimale Hemmkonzentrationswerte für den bei der Passagierung ohne Antibiotikum gefundenen β -laktamasenegativen Stamm... 22
4.2.2.4.	Minimale Hemmkonzentrationswerte für die bei der Passagierung in Gegenwart von Ceftizoxim in der Konzentration von 0,002 $\mu\text{g/ml}$ gefundenen β -laktamasenegativen Stämme..... 23
4.2.2.5.	Minimale Hemmkonzentrationswerte für die bei der Passagierung in Gegenwart von Ceftizoxim in der Konzentration von 0,000125 $\mu\text{g/ml}$ gefundenen β -laktamasene- gativen Stämme..... 23
4.2.2.6.	Vergleich der minimalen Hemmkonzentra- tionswerte von plasmidtragenden Stämmen und den geometrischen Mitteln der mini- malen Hemmkonzentrationswerte der davon abgeleiteten β -laktamasenegativen Stämme..23
4.2.2.7.	Ergebnis der statistischen Auswertung der Häufigkeit der Plasmidverluste mit- tels χ^2 -Test und Vierfeldertafel..... 26
5.	Diskussion..... 27
6.	Zusammenfassung..... 32

	Seite
7. Verzeichnis der Tabellen.....	35
8. Literaturverzeichnis.....	37

1. Einleitung

Nach den Erkältungskrankheiten stellt die Gonorrhoe die wohl häufigste ansteckende Krankheit der Welt dar (Petzoldt, 1981). Ihr Erreger, *Neisseria gonorrhoeae*, wurde früher generell als empfindlich gegenüber Penicillin oder Penicillinderivaten angesehen (Roberts et al., 1977).

Eine kontinuierlich abnehmende Empfindlichkeit der Gonokokken gegenüber Penicillin konnte zunächst durch die Gabe immer größerer Mengen an Antibiotikum kompensiert werden (Petzoldt, 1981).

1976 traten jedoch erste Fälle auf, in denen Behandlungsversuche, selbst mit hochdosiertem Penicillin, erfolglos blieben (Phillips, 1976).

Erstmalig konnten plasmidtragende, β -laktamasebildende Gonokokkenstämme isoliert werden (Ashford u. Golash, 1976; Phillips, 1976).

Durch die im Fernen Osten praktizierte Methode der Selbstbehandlung Prostituerter mit oral verabreichtem Penicillin, meist in zu niedrigen Dosen, was einen Selektionsvorteil für β -laktamasebildende Stämme darstellt (Piot, 1978), stieg der Prozentsatz an plasmidtragenden Stämmen 1977 dort bis auf 40% (Sparling et al., 1977), bis 1983 sogar bis über 50% an (Brown et al., 1982). Auch in Mitteleuropa nähert sich der Anteil β -laktamasebildender Stämme bereits der 5% Marke (Eichmann, 1984). In Amsterdam, wo etwa die Hälfte aller Gonokokken der Niederlande isoliert werden, produzierten im Oktober 1980 79% der gefundenen Stämme β -Laktamase (van Embden et al., 1980; van Embden et al., 1981).

Ursprünglich soll das Penicillinase-Plasmid von *Haemophilus influenzae* auf *Neisseria gonorrhoeae* übertragen worden sein (Sparling et al., 1978).

Auch können die Plasmide, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß und abhängig von den Selektionsbedingungen, wieder abgegeben werden (Roberts et al., 1977).

Vor der breiten Einführung der Cephalosporine in die Therapie der Gonorrhoe sollten daher Kenntnisse über die Auswirkungen dieser Chemotherapeutika auf die Häufigkeit der Abgabe der Plasmide gewonnen werden.

Obwohl Ergebnisse aus in vitro-Experimenten nicht einfach auf Verhältnisse in vivo übertragen werden können (Roberts et al., 1977; van Embden et al., 1980), soll in dieser Arbeit der Versuch unternommen werden, die Fragen zur Stabilität der Plasmide bei β -laktamasebildenden Gonokokkenstämmen unter dem Einfluß von Ceftizoxim, einem Vertreter der neuen Generation der Cephalosporine (Neu, 1982) sowie zu den Auswirkungen des Plasmidverlustes auf die Antibiotikaempfindlichkeit zu beantworten.

2. Material

2.1. Herstellung der Agarplatten

Hierzu wurde in 500ml Aqua dest. 10g Hemoglobin (Difco, Detroit, Michigan, USA) gelöst und mit einem Tropfen Silikon-Antischaumemulsion (Serva, Heidelberg, D) versetzt. Analog wurde in weitere 500ml Aqua dest. 45g Proteose Nr.3 Agar (Difco, Detroit, Michigan, USA), ebenfalls mit Antischaumemulsion, eingebracht.

Beide Ansätze wurden im Autoklaven (Aigner, München; D) 30' bei 120°C autoklaviert. Danach wurden die Glasbehälter mit den Ansätzen im Wasserbad (Memmert, Schwabach, D) langsam bis auf ca. 56°C abgekühlt. Sodann wurden auf dem Magnetrührer (Jahnke und Kunkel, Staufen, D) beide Ansätze vermischt sowie 20ml steriles Iso Vitale X Enrichment (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, USA) zugegeben. Abschließend wurde der Nährboden mit dem Petrimaten (Struers, Düsseldorf, D) unter sterilen Bedingungen in 9 x 1,5 cm großen Petrischalen ausplattiert. Die Füllmenge pro Platte betrug 25ml. Vor der Benutzung wurden die Platten wenigstens 24 Stunden gelagert. Unmittelbar vor dem Beimpfen wurden die Platten in den Brutschrank (Heraeus, Hanau, D) gestellt, bis diese genügend temperiert waren, um so ein optimales Anwachsen der Keime zu gewährleisten.

2.2. Herstellung der Platten für den Zuckervergarungstest

Hierzu benötigt man 41g Columbia-Agar (BAG, Lich, D), der in 1000ml Aqua dest. eingebracht wird. Nach dem Quellen des Agars wird 30' bei 120°C autoklaviert.

Ist der Ansatz auf ca. 56°C abgekühlt, gibt man 10ml Phenolrot (5%ige Lösung) und 20ml PPL0-Serum Fraction (Difco, Detroit, Michigan, USA) zu. Mit dem Petrimat (Struers, Düsseldorf, D) werden analog zu 2.1. die Platten beschickt.

2.3. Herstellung der Bouillon zur Anzüchtung und Passagierung von Gonokokken im flüssigen Medium

Im Versuch wurde eine Bouillon nach Hafiz und Mc Entegart (Hafiz und Mc Entegart, 1976), jedoch modifiziert, verwendet. Zur Herstellung der Bouillon wird in 1l Aqua dest. 15g Proteose Peptone Nr. 3 (Difco, Detroit, Michigan, USA), 5g Natriumchlorid, 1g Kaliumdihydrogenphosphat, 4g Dikaliumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, D), 1g Stärke Soluble Starch (Difco, Detroit, Michigan, USA) sowie ein Tropfen der Silikon-Antischaumemulsion (Serva, Heidelberg, D) gelöst. Nach 30' Autoklavieren bei 120°C und Abkühlen der Lösung auf ca. 56°C wurde 10ml Iso Vitale X Enrichment (BBL, Cockeysville, USA), 4g Glukose und 42mg Bikarbonat, beides im Iso Vitale X gelöst, durch einen Sterifilter (Sartorius, Göttingen, D) zugegeben und vermischt.

Die Bouillon wurde auf einen pH-Wert von 7,2 bis 7,4 eingestellt, bei dem die Gonokokken sehr gut anwachsen.

In Vorversuchen erwies sich eine Füllmenge von 5ml pro Reagenzglas (130 x 14 mm) als vorteilhaft für das Anwachsen im Schüttelwasserbad (Köttermann, Hänigsen, D) bei 37°C.

2.4. Einfriermedium

Zum Einfrieren der Stämme wurde fetales Kälberserum (Gibco, Chagrin Falls, Ohio, USA), versetzt mit 10% Saccharose (Merck,

Darmstadt, D), verwendet.

Die Bakterien wurden mit der Öse von den Agarplatten abgestrichen, in das Medium eingebracht und bei -80°C tiefgefroren.

2.5. Bakterienstämme

Im Versuch wurde mit *Neisseria gonorrhoeae* Stämmen aus der Sammlung der letzten Jahre der Dermatologischen Klinik München gearbeitet. Die Stämme waren bereits nach der Methode von Carifo und Catlin auxotypisiert (Carifo u. Catlin, 1973). Es wurden 3 Stämme des Auxotyp 1 sowie 3 Stämme vom Auxotyp 2 verwendet. Alle Stämme wurden dem Test mit chromogenem Cephalosporin (O'Callaghan et al., 1972) unterzogen und bildeten β -Laktamase. Zu Vergleichszwecken dienten die WHO-Stämme III, V und VII.

Die Stämme waren bei -80°C im Einfriermedium tiefgefroren, wurden zu Versuchsbeginn aufgetaut und auf Platten kultiviert.

Registriernummer	Auxotyp
160/83	1
5729/83	1
1327/83	1
1608/83	2
9120/83	2
120/83	2

Tabelle 1: Aufstellung der β -laktamasebildenden Gonokokkenstämme



2.6. Antibiotika

Die Versuche zur Plasmidstabilität wurden unter dem Einfluß von Ceftizoxim (Fujisawa, Osaka, Japan) durchgeführt. Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration sowie zu Kontrollzwecken wurde Penicillin G (Grünenthal GmbH, Stolberg, D), Cefazolin (Fujisawa, Osaka, Japan) und Cephalothin (Lilly GmbH, Gießen, D) eingesetzt, die von den Anbieterfirmen (Grünenthal GmbH, Stolberg, D; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D) zur Verfügung gestellt wurden. Zur Gewichtsbestimmung der Antibiotika waren folgende Korrekturfaktoren zu berücksichtigen:

Antibiotikum	Korrekturfaktor
Cefazolin	1,07
Cephalothin	1,086
Ceftizoxim	1,13

Tabelle 2: Antibiotika und zugehörige Korrekturfaktoren zur Gewichtsbestimmung

Für Penicillin G war kein Korrekturfaktor zu beachten.

3. Methoden

3.1. Vorversuche

3.1.1. Empfindlichkeitsbestimmung mittels des Agar-Dilutionstests

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mittels des Agar-Dilutionstests (Korting, 1984) wurden zunächst Agarplatten mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen hergestellt (Verfahren in 2.1. beschrieben; ergänzend wurde nach dem Abkühlen des Nährmediums auf ca. 56°C die entsprechende Menge an Antibiotikum zugegeben).

So wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe Platten mit Antibiotikakonzentrationen für Ceftizoxim von 0,001; 0,002; 0,004; 0,008; 0,016; 0,032; 0,064 µg/ml hergestellt.

Für Penicillin wurden die Konzentrationen 64; 128; 256; 1024 und 2048 µg/ml berücksichtigt.

Mit dem Multipoint-Inoculator (Mast Diagnostika, Hamburg, D) wurden die Platten beimpft:

Nach Lösen der Gonokokken bis zur optischen Dichte von 0,15 bei 500nm Wellenlänge im Spektralphotometer Spectronic 20 (Bausch and Lomb, Chicago, USA) in Standard-1-Nährbouillon (Merck, Darmstadt, D) wurden mit dem Beimpfungsgerät definierte Mengen der einzelnen Gonokokkensuspensionen auf die Platten aufgebracht. Nach 24stündigem Anwachsen im Brutschrank (Heraeus, Hanau, D) in 5%iger CO₂-Atmosphäre wurde abgelesen, wobei die erste Verdünnungsstufe, die optisch sichtbares Wachstum verhinderte, die minimale Hemmkonzentration (MHK) darstellte.

3.1.2. Empfindlichkeitsbestimmung mittels des Bouillonverdünnungstests

Zur Empfindlichkeitsbestimmung im flüssigen Medium (Korting u.Beckenkamp,1985) wurde die in 2.3.beschriebene Nährbouillon verwendet.In den Reagenzgläsern wurden die Antibiotikakonzentrationen 0,001;0,002;0,004; 0,008;0,016;0,032 und 0,064 µg/ml für Cefprozid eingestellt.Entsprechend wurden für Penicillin G die Verdünnungsstufen 128;256;512;1024 und 2048 µg/ml berücksichtigt.

Sterile Reagenzgläser wurden mittels des Seriodosierers (Selzer,Waghäusel,D) mit je 5ml Bouillon gefüllt,die entsprechende Menge an Antibiotikum zugegeben,Gonokokken bis zur optischen Dichte von 0,15 bei 500nm im Spektralphotometer eingebracht und im Schüttelwasserbad (Köttermann, Hänigsen,D) bebrütet.

Nach 24 Stunden wurde die Auswertung im Photometer vorgenommen:war im Reagenzglas ein Anwachsen der Keime erfolgt, stieg die optische Dichte der Suspension deutlich an.

Nach Messen der optischen Dichte in der gesamten Reihe der Verdünnungsstufen konnte so die erste Antibiotikumkonzentration,die ein Wachstum der Keime verhinderte,also die MHK, bestimmt werden.

3.1.3. Zuckervergärungstest

Zur Identifikation der Gonokokkenstämme wurde unter anderem ein Zuckervergärungstest durchgeführt.

Auf die nach 2.2 hergestellten Platten überimpfte man mit der Platinöse flächenhaft Gonokokken.

Sodann wurden verschiedene Zuckerplättchen (bio Mérieux, Charbonnières les Bains, Frankreich), die Maltose, Dextrose bzw. Saccharose enthielten, aufgelegt. Nach 24 Stunden Bebrüten zeigte sich um das Zuckerplättchen, dessen Bestandteil vergoren werden konnte, ein heller Hof.

Wird nur Dextrose vergoren, so handelt es sich eindeutig um *Neisseria gonorrhoeae*. Andere Neisserien würden ein abweichendes Vergärungsmuster vorweisen (Petzoldt, 1981).

3.1.4. Nitrocefin-Test, Oxydasetest, Gram-Färbung

Zur Prüfung der β -Laktamasebildung wurden die einzelnen Gonokokkenstämme dem Test mit chromogenem Cephalosporin (O'Callaghan et al., 1972) unterzogen.

Hierzu wurden Cefinase-Discs (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, USA) verwendet. Nach Anfeuchten des Testplättchens mit einem Tropfen sterilen Wassers brachte man mit der Platinöse Gonokokken auf. Nach kurzer Zeit (30-60'') zeigte sich eine deutliche rote Färbung des Plättchens mit chromogenem Cephalosporin, wenn der aufgebraute Keim β -Laktamase bildete.

Zur weiteren Identifizierung der Stämme wurde ein Test zum Nachweis des Enzyms Cytochromoxydase durchgeführt.

Mit der Öse wurden Gonokokken auf die PathoTec-CO Teststreifen (Gödeke, Freiburg, D) aufgebracht und verrieben. Ein positives Ergebnis zeigte sich durch deutliche Blaufärbung der bestrichenen Stellen des Streifens.

Abschließend wurden zur Identifikation Gram-Färbepreparate von allen verwendeten Stämmen hergestellt, auch um eventuelle Verunreinigung der Ansätze mit verschleppten Keimen auszuschließen.

3.1.5. Keimzahlbestimmung

Im Rahmen der Vorversuche wurde eine Keimzahlbestimmung durchgeführt.

Zunächst stellte man eine Verdünnungsreihe, ausgehend von einer Gonokokkensuspension mit der optischen Dichte von 0,15 bei 500nm im Spektralphotometer, her. Als Medium wurde die in 2.3. beschriebene Bouillon verwendet.

Sterile Reagenzgläser wurden mit 0,9ml Bouillon beschickt. Mit einer Kolbenhubpipette (Eppendorf, Hamburg, D) brachte man aus der Gonokokkensuspension 100 μ l in ein Reagenzglas ein, was einer Verdünnung von 10^{-1} entsprach. Nach gutem Durchmischen wurden aus diesem Reagenzglas 100 μ l in das nächste Glas pipettiert (Verdünnung $\approx 10^{-2}$).

Analog wurden Verdünnungen bis 10^{-9} hergestellt. Sodann wurden aus jedem Reagenzglas 100 μ l mit der Eppendorf Pipette auf Agarplatten aufgebracht, mit einem sterilen Glaspatel gleichmäßig verteilt und bei 37°C im Brutschrank 24 Stunden bebrütet. Zu Vergleichszwecken wurden 4 Versuchsreihen durchgeführt.

Zur Auswertung wurden Platten mit derjenigen Verdünnungsstufe ausgewählt, die Einzelkolonien enthielten, die räumlich soweit auseinanderlagen, daß sie sich im Wachstum nicht beeinflussen konnten.

Nach Auszählen der Kolonien auf der Platte konnte mit den Verdünnungsfaktoren auf die Keimzahl rückgeschlossen werden.

3.2. Hauptversuch: Versuch zur Häufigkeit des Plasmid-verlustes im flüssigen Medium

3.2.1. Versuchsansatz und Herstellung der Gonokokken-ausgangssuspensionen

Die Versuche zur Plasmidstabilität sollten unter dem Einfluß von Ceftizoxim sowie zu Vergleichszwecken auch ohne jegliche Antibiotikuzugabe durchgeführt werden.

Basierend auf den Ergebnissen der MHK-Bestimmung der Vorversuche in Bouillon, die für Ceftizoxim Werte von 0,004 und 0,008 µg/ml für die einzelnen Stämme ergab, wurden diejenigen Konzentrationen festgesetzt, die bei den Versuchen berücksichtigt werden sollten. Als höhere Antibiotikumkonzentration wurde 0,002 µg/ml, als niedrigere Konzentration 0,000125 µg/ml gewählt.

Als Nährlösung wurde die in Punkt 2.3. beschriebene Bouillon verwendet.

Die in Punkt 2.5. aufgelisteten Stämme wurden zu Versuchsbeginn aufgetaut, auf Agarplatten angezüchtet und zur Identifikation dem Nitrocefin- und Oxydasetest zugeführt. Weiterhin wurden die Eigenschaften der Zuckervergärung untersucht sowie Gramfärbepreparate angefertigt.

Nach 24stündigem Anwachsen wurde von jedem Stamm eine Einzelkolonie subkultiviert. Am folgenden Tag begann man mit dem so gewonnenen Material die Versuche.

Zunächst wurden von allen Stämmen Suspensionen der optischen Dichte von 0,15, entsprechend 10^4 Keimen/µl, durch Messung im Spektralphotometer Spectronic 20 (Bausch and Lomb, Chicago, USA) bei einer Wellenlänge von 500nm hergestellt.

Bei dem Versuchsweg ohne Antibiotikum wurden 5ml Gonokokkensuspension in die Reagenzgläser eingebracht und mit sterilen Stopfen verschlossen. Für die Versuche mit Antibiotikum wurden 4,9ml der Suspension abgefüllt. Die benötigte Ceftizoximmenge wurde mit 100µl sterilem Aqua dest. eingebracht.

3.2.2. Vorbereitung der benötigten Antibiotikallösungen

Für die 30 Passagierungen wurden die benötigten Antibiotikallösungen unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren hergestellt und in Eppendorf-Gefäßen (Eppendorf, Hamburg, D) steril bei -80°C tiefgefroren.

Am Versuchstag wurde jeweils die erforderliche Menge bei Zimmertemperatur aufgetaut.

3.2.3. Tägliches Subkultivieren und Prüfung der β -Laktamasebildung

Nach Zugabe des Antibiotikums wurden die Ansätze in den Reagenzgläsern auf dem Exzenterrüttler (Cenko, Breda, Niederlande) gut durchgemischt und im Schüttelwasserbad (Köttermann, Hänigsen, D) bei 37° Wassertemperatur und mittlerer Rüttelgeschwindigkeit bebrütet.

Durchschnittlich wuchsen die Gonokokken innerhalb der Inkubationszeit von 24 Stunden bis zur optischen Dichte von 0,5-0,6 ab. Aus diesen Bakteriensuspensionen vom Vortag wurden erneut 5ml Suspension durch Verdünnung mit frischer Bouillon auf die optische Dichte von 0,15 eingestellt.

Die jeweilige Antibiotikummenge wurde zugegeben und der Ansatz für weitere 24 Stunden im Wasserbad kultiviert. Danach brachte man je 100 μ l von jedem Stamm aus der Passagierung in der höheren und niedrigeren Konzentration sowie von jedem Stamm aus der Kultivierung ohne Antibiotikum auf Agarplatten auf.

Nach 24 Stunden Bebrüten dieser Platten im Brutschrank wurden die Gonokokken mittels des Nitrocefin-Tests auf die Fähigkeit zur β -Laktamasebildung überprüft.

3.2.4. Empfindlichkeitsbestimmung mittels des Agar-Dilutionstests nach Abschluß des Versuchs

Nachdem die Versuche über 30 Tage durchgeführt worden waren, wurden alle Stämme, sowie zu Vergleichszwecken die WHO-Stämme III, V und VII, erneut einer MHK-Bestimmung für Ceftizoxim, Penicillin, Cephalothin und Cefazolin auf Platten unterzogen. Hierzu wurde wie in Punkt 3.1.1. verfahren.

3.2.5. Abschließende Prüfung der Plasmidverluste

Zur Bestimmung der Häufigkeit des Plasmidverlusts wurden von jedem Stamm je 100 Einzelkolonien aus der Passagierung mit Ceftizoxim in der Konzentration von 0,002 μ g/ml, aus der Passagierung mit Ceftizoxim in der Konzentration von 0,000125 μ g/ml sowie aus der Anzüchtung ohne Antibiotikumzugabe auf die Eigenschaft der β -Laktamasebildung untersucht. Bei der Auswahl der 100 Einzelkolonien wurden möglichst morphologisch unterschiedliche berücksichtigt.

3.2.6. Identifizierung der β -laktamasenegativen Varianten

Abschließend wurde von jedem Stamm der Versuchsreihe Material im Einfriermedium bei -80°C tiefgefroren. Alle nach Abschluß der Passagierung gefundenen β -laktamasenegativen Stämme wurden mit Hilfe von Koloniemorphologie, Oxydasetest, Zuckervergärungstest und Gram-Färbung identifiziert, einer Empfindlichkeitstestung gegenüber Penicillin, Ceftizoxim, Cephalothin und Cefazolin mittels Agardilutionstest zugeführt und ebenfalls bei -80°C im Einfriermedium tiefgefroren.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Vorversuche

4.1.1. Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung mittels des Agar-Dilutionstests

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration ergab für Ceftizoxim folgende Werte:

Stamm-Nr.	MHK-Wert in $\mu\text{g/ml}$	Auxotyp
160/83	0,016	1
5729/83	0,016	1
1327/83	0,016	1
1608/83	0,008	2
9120/83	0,008	2
120/83	0,008	2

Tabelle 3: MHK-Werte der eingesetzten Stämme für Ceftizoxim aus dem Vorversuch (Agar-dilutionstest)

Die Werte für Penicillin zeigt Tabelle 4:

Stamm-Nr.	MHK-Wert in µg/ml	Auxotyp
160/83	256	1
5729/83	512	1
1327783	512	1
1608/83	512	2
9120/83	512	2
120/83	256	2

Tabelle 4: MHK-Werte der eingesetzten Stämme für Penicillin aus dem Vorversuch (Agar-dilutionstest)

4.1.2. Ergebnisse der Empfindlichkeitsbestimmung mittels des Bouillon-Verdünnungstests

Stamm-Nr.	MHK-Wert in µg/ml	Auxotyp
160/83	0,008	1
5729/83	0,008	1
1327/83	0,008	1
1608/83	0,008	2
9120/83	0,004	2
120/83	0,004	2

Tabelle 5: MHK-Werte der eingesetzten Stämme für Cefprozid aus dem Vorversuch (Bouillon-Verdünnungstest)

Stamm-Nr.	MHK-Wert in µg/ml	Auxotyp
160/83	512	1
5729/83	512	1
1327/83	512	1
1608/83	512	2
9120/83	512	2
120/83	512	2

Tabelle 6: MHK-Werte der eingesetzten Stämme für Penicillin aus dem Vorversuch (Bouillon-Verdünnungstest)

4.1.3. Ergebnisse des Zuckervergärungstests

Nachdem die nach Punkt 3.1.3. beimpften Platten 24 Stunden bebrütet worden waren, zeigte sich bei allen Stämmen ein heller Hof um das Testplättchen mit Dextrose, nicht jedoch um Maltose und Saccharose.

Es wurde also nur Dextrose vergoren, was dem Vergärungsmuster von *Neisseria gonorrhoeae* entspricht.

4.1.4. Ergebnisse des Nitrocefin- und Oxydasetests sowie der Gramfärbungen

Gemäß der Aussage des Tests mit chromogenen Cephalosporin bildeten alle eingesetzten Stämme β -Laktamase. Das Enzym Cytochromoxydase konnte bei allen Stämmen mit dem PathoTec- CO Teststreifen nachgewiesen werden. Die Gram-Färbepreparate zeigten das typische Bild gram-negativer Diplokokken.

4.1.5. Ergebnis der Keimzahlbestimmung

Die Bestimmung der Keimzahl erbrachte ein Ergebnis von $1,2 \times 10^4$ Keimen pro μl .

Die Ergebnisse aus den vier parallel durchgeführten Versuchen zeigten keine Abweichungen voneinander.

4.2. Ergebnisse der Hauptversuche

4.2.1. Häufigkeit der Plasmidverluste

Bei der Testung von je 100 morphologisch möglichst unterschiedlichen Einzelkolonien nach 30tägiger Passagierung in Anwesenheit von Ceftizoxim wurden insgesamt 9 Kolonien gefunden, die gemäß der Aussage des Nitrocefintests keine β -Laktamase mehr bildeten, also ihr Plasmid abgegeben hatten. Sie verteilen sich wie die Tabellen 7-9 zeigen:

Stamm-Nr.	Anzahl der β -laktamase-negativen Varianten	Anzahl der untersuchten Einzelkolonien
160/83	0	100
5729/83	0	100
1327/83	1	100
1608/83	0	100
9120/83	1	100
120/83	0	100

Tabelle 7: Häufigkeit der Plasmidverluste während der Passagierung in der Ceftizoximkonzentration von 0,002 μ g/ml

Auxotyp 1: 160/83;5729/83;1327/83

Auxotyp 2: 1608/83;9120/83;120/83

Stamm-Nr.	Anzahl der β -laktamase-negativen Varianten	Anzahl der untersuchten Einzelkolonien
160/83	0	100
5729/83	2	100
1329/83	3	100
1608/83	0	100
9120/83	2	100
120/83	0	100

Tabelle 8: Häufigkeit der Plasmidverluste während der Passagierung in der Ceftizoximkonzentration von 0,000125 μ g/ml

Auch nach der 30tägigen Passagierung ohne Antibiotikum wurden von jedem Stamm je 100 Einzelkolonien ausgewählt und auf ihr Fähigkeit zur β -Laktamasebildung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt:

Stamm-Nr.	Anzahl der β -laktamase-negativen Varianten	Anzahl der untersuchten Einzelkolonien
160/83	1	100
5729/83	0	100
1327/83	0	100
1608/83	0	100
9120/83	0	100
120/83	0	100

Tabelle 9: Häufigkeit der Plasmidverluste während der Passagierung ohne Antibiotikum

4.2.2. Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels des Agar-Dilutionstests nach Abschluß der Hauptversuche

4.2.2.1. Minimale Hemmkonzentrationswerte für die eingesetzten β -laktamasebildenden Gonokokkenstämme

Stamm-Nr.	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Penicillin</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Ceftizoxim</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Cefazolin</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Cephalothin</u>
160/83	256	0,016	8	16
5729/83	256	0,016	8	16
1327/83	512	0,008	4	8
1608/83	512	0,008	8	16
9120/83	512	0,008	8	16
120/83	256	0,008	8	16

Tabelle 10: MHK-Werte der eingesetzten Gonokokkenstämme nach Abschluß des Hauptversuchs für Penicillin, Ceftizoxim, Cefazolin und Cephalothin

4.2.2.2. Minimale Hemmkonzentrationswerte für die eingesetzten WHO-Stämme III, V und VII

Stamm-Nr.	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Penicillin</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Ceftizoxim</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Cefazolin</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Cephalothin</u>
WHO-III	0,0125	0,002	0,5	0,5
WHO-V	0,5	0,016	2	2
WHO-VII	0,064	0,004	1	1

Tabelle 11: MHK-Werte für die WHO-Stämme III, V u. VII

4.2.2.3. Minimale Hemmkonzentrationswerte für den bei der Passagierung ohne Antibiotikum gefundenen β -laktamasenegativen Stamm

Stamm-Nr.	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Penicillin</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Ceftizoxim</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Cefazolin</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Cephalothin</u>
160/83	2	0,016	2	8

Tabelle 12: MHK-Werte für den bei Passagierung ohne Antibiotikum gefundenen β -laktamasenegativen Stamm

4.2.2.4. Minimale Hemmkonzentrationswerte für die bei der Passagierung in Gegenwart von Ceftizoxim in der Konzentration von $0,002\mu\text{g/ml}$ gefundenen β -laktamasenegativen Stämme

Stamm-Nr.	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Penicillin</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Ceftizoxim</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Cefazolin</u>	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$) für <u>Cephalothin</u>
1327/83	4	0,016	4	8
9120/83	4	0,016	4	16

Tabelle 13: MHK-Werte für die unter dem Einfluß von Ceftizoxim in der Konzentration von $0,002\mu\text{g/ml}$ gefundenen plasmidfreien Kolonien

4.2.2.5. Minimale Hemmkonzentrationswerte für die bei Passagierung in Gegenwart von Ceftizoxim in der Konzentration von 0,000125µg/ml gefundenen β -laktamasenegativen Stämme

Stamm-Nr.	MHK-Wert (µg/ml) für <u>Penicillin</u>	MHK-Wert (µg/ml) für <u>Ceftizoxim</u>	MHK-Wert (µg/ml) für <u>Cefazolin</u>	MHK-Wert (µg/ml) für <u>Cephalothin</u>
5729/83	2	0,008	2	4
5729/83	2	0,008	2	4
1327/83	2	0,016	8	16
1327783	4	0,016	4	8
1327/83	4	0,016	4	8
9120783	4	0,016	8	16
9120/83	4	0,016	4	16

Tabelle 14: MHK-Werte für die unter Einfluß von Ceftizoxim in der Konzentration von 0,000125µg/ml gefundenen plasmidfreien Kolonien

4.2.2.6. Vergleich der minimalen Hemmkonzentrationswerte von plasmidtragenden Stämmen und den geometrischen Mitteln der minimalen Hemmkonzentrationswerte der davon abgeleiteten β -laktamasenegativen Stämme

Plasmidfreie Varianten konnten bei den Stämmen 5729/83, 1327/83 und 9120/83 gefunden werden.

Um die Auswirkungen des Plasmidverlustes auf die Antibiotikaempfindlichkeit zu verdeutlichen, wurden die MHK-Werte von entsprechenden plasmidtragenden Stämmen und die geome-

trischen Mittel der MHK-Werte der davon abgeleiteten plasmidfreien Varianten gegenübergestellt.

Die Ergebnisse zeigen die folgenden Tabellen:

Empfindlichkeitswerte für Ceftizoxim in µg/ml:

Stamm-Nr.	MHK-Werte der plasmidtragenden Stämme	geometr.Mittel der MHK-Werte der abgeleiteten β-laktamase-negativen Varianten
5729/83	0,016	0,008
1327/83	0,008	0,016
9120/83	0,008	0,016

Tabelle 15: Empfindlichkeiten gegenüber Ceftizoxim von plasmidtragenden Stämmen und den davon abgeleiteten plasmidfreien Varianten(geometr. Mittelwerte)

Empfindlichkeitswerte für Penicillin in µg/ml:

Stamm-Nr.	MHK-Werte der plasmidtragenden Stämme	geometr.Mittel der MHK-Werte der abgeleiteten β-laktamase-negativen Varianten
5729/83	256	2
1327783	512	3
9120/83	512	4

Tabelle 16: Empfindlichkeiten gegenüber Penicillin von plasmidtragenden Stämmen und den davon abgeleiteten plasmidfreien Varianten(geometr. Mittelwerte)

Empfindlichkeitswerte für Cephalothin in µg/ml:

Stamm-Nr.	MHK-Werte der plasmidtragenden Stämme	geometr.Mittel der MHK-Werte der abgeleiteten β -laktamase-negativen Varianten
5729/83	16	4
1327783	8	10
9120/83	16	16

Tabelle 17: Empfindlichkeiten gegenüber Cephalothin von plasmidtragenden Stämmen und den davon abgeleiteten plasmidfreien Varianten(geometr. Mittelwerte)

Empfindlichkeitswerte für Cefazolin in µg/ml:

Stamm-Nr.	MHK-Werte der plasmidtragenden Stämme	geometr.Mittel der MHK-Werte der abgeleiteten β -laktamase-negativen Varianten
5729/83	8	2
1327/83	4	5
9120/83	8	6

Tabelle 18: Empfindlichkeiten gegenüber Cefazolin von plasmidtragenden Stämmen und den davon abgeleiteten plasmidfreien Varianten(geometr. Mittelwerte)

4.2.2.7. Ergebnis der statistischen Auswertung der Häufigkeit der Plasmidverluste mittels χ^2 -Tests und Vierfeldertafel

Die statistische Auswertung der Häufigkeiten der Plasmidabgaben unter dem Einfluß von Cefprozid im Vergleich mit der Plasmidabgabehäufigkeit bei der Passagierung ohne Antibiotikum zeigte, daß Gonokokken unter dem Selektionsdruck von Cefprozid ihr R-Plasmid verstärkt abgeben.
(Der ermittelte Wert für χ^2 beträgt 4,53, was einer statistischen Aussagesicherheit von 97% entspricht.)

5. Diskussion

Kurz nach dem Auftreten der ersten β -laktamaseproduzierenden Gonokokkenstämme wurden von Percival et al. (Percival et al., 1976) und Roberts et al. (Roberts et al., 1977) Versuche durchgeführt, die Stabilität der R-Plasmide zu ergründen.

Das Verhalten der Plasmide wurde in Versuchsansätzen unter dem Einfluß von Penicillin, aber auch auf antibiotikafreien Nährböden getestet (Roberts et al., 1977).

Erwartungsgemäß zeigte sich unter dem Selektionsdruck von Penicillin keine Instabilität, auch nicht nach einer langen Passagierungszeit von 8 Wochen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Ceftizoxim, einem gegen *Neisseria gonorrhoeae* hochwirksamen Cephalosporin (Korting, 1984), auf den Plasmidverlust und, abweichend zu früheren Versuchen auf festen Nährmedien, nun das Verhalten im Flüssigmedium untersucht.

Die Versuche zur Häufigkeit des Plasmidverlustes wurden bei einer Ceftizoximkonzentration von $0,002 \mu\text{g/ml}$ und bei $0,000125 \mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Nach der 30tägigen Passagierung bei einer Antibiotikumkonzentration von $0,002 \mu\text{g/ml}$ ergaben sich Häufigkeiten zwischen 0 und 1 %. (vgl. Tabelle Nr. 7)

Unter den selektiven Bedingungen während der Einwirkung von Ceftizoxim zeigten die Gonokokken eine höhere Tendenz, ihr Plasmid abzugeben als in dem Vergleichsansatz ohne Antibiotikum, wo nahezu keine Plasmidabgabe zu beobachten war.

Bei der Anzüchtung in einer Ceftizoximkonzentration von $0,000125 \mu\text{g/ml}$ konnten noch häufigere Plasmidverluste beobachtet werden. Je nach Stamm differierten sie zwischen 0 und 3 %.

Die Versuchsergebnisse können jedoch keine Auskunft darüber geben, weshalb gerade in der geringeren Konzentration von Ceftizoxim mehr Plasmidabgaben zu beobachten waren.

Es ist jedoch zu fragen, inwieweit dies als biologisch relevant anzusehen ist.

Gemäß der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse mittels des χ^2 -Tests und der Vierfeldertafel konnte gezeigt werden, daß Cefprozim in subinhibitorischen Konzentrationen die Häufigkeit der Plasmidabgabe bei *Neisseria gonorrhoeae* im Flüssigmedium beeinflußt.

Obwohl Ergebnisse, die in vitro gewonnen wurden, nicht einfach auf Verhältnisse in vivo übertragbar sind (van Embden et al., 1980; Roberts et al., 1977), so könnte der hier dargestellte Tatbestand doch dazu beitragen, die breitere Einführung von Cefprozim in die Therapie der Gonorrhoe positiv zu beeinflussen.

Nach der zu Vergleichszwecken durchgeführten 30tägigen Passagierung von Gonokokken ohne Zugabe jeglichen Antibiotikums zeigte sich nahezu keine Instabilität der Plasmide. Von den sechs untersuchten Stämmen des Auxotyps 1 und 2 wurde bei je 100 getesteten, morphologisch möglichst unterschiedlichen Einzelkolonien lediglich eine einzige Plasmidabgabe nachgewiesen.

Van Embden et al. hingegen beobachteten bei der Passagierung auf antibiotikafreien Nährböden einen Plasmidverlust von ca. 2% (van Embden et al., 1980). Hierfür dürften mehrere Gründe verantwortlich sein:

Generell konnten Aktivitätsunterschiede der Gonokokken, ausgehend von den Kulturmedien, gezeigt werden. So wiesen Kirven und Thornsberry deutliche Unterschiede bei der Weitergabe des R-Plasmids auf Empfängerstämme nach; während bei den Transferstudien auf Agarplatten zahlreiche Plasmidübergaben beobachtet wurden, fand bei den Versuchen, die im flüssigen Medium durchgeführt worden waren, nahezu kein Transfer statt (Kirven und Thornsberry, 1977). Weiterhin kann eine allgemeine Tendenz zu immer höherer Plasmidstabilität beobachtet werden. Schon im Jahre 1976 zeigten sich bemerkenswerte Unterschiede.

Die Stämme mit dem höheren Plasmidverlust wurden im Fe-

bruar 1976 isoliert, wogegen die im September des gleichen Jahres gewonnenen Stämme ihr Plasmid in einem viel geringeren Prozentsatz abgaben (Roberts et al., 1977). Für die Stabilität des Resistenzplasmid soll ein 24,5 MDalton großes Plasmid ausschlaggebend sein, welches sich schnell im gesamten Pool der penicillinasebildenden Gonokokken ausbreitet (Roberts et al., 1977).

Roberts und Mitarbeiter stellten 1976 fest, daß bereits 50% der Gonokokken mit dem 4,6 MDalton großen Plasmid auch das 24,5 MDalton Plasmid enthalten (Roberts et al., 1977). Die von uns eingesetzten Gonokokkenstämme wurden 1983 isoliert und ließen sich alle auf eine fernöstliche Abstammung zurückführen. Demnach sollten sie das 4,6 MD große Resistenzplasmid besitzen. Dieses weist gegenüber dem 3,2 MD großen Plasmid, welches ebenfalls die β -Laktamaseproduktion bei den Gonokokken, allerdings der sogenannten "Afrika-Stämme" (Dickgießer, 1983), codiert, eine höhere Stabilität auf (Roberts et al., 1977).

Dieser Trend zu höherer Plasmidstabilität wird auch durch die Untersuchungen von van Embden et al. 1983 bestätigt (van Embden et al., 1983).

Während Percival et al. 1976 noch bis zu 5% Plasmidverluste auf antibiotikafreien Nährböden nachwiesen, zeigten sich im Jahre 1980 bei analog durchgeführten Untersuchungen ca. 2% plasmidfreie Varianten (Percival et al., 1976).

Im weiteren wurden die Auswirkungen des Plasmidverlusts auf die Empfindlichkeit der Gonokokken gegenüber Ceftriaxon, Penicillin, Cephalothin und Cefazolin untersucht. Die MHK-Werte der Stämme mit Plasmid und ihrer β -laktamase-negativen Varianten wurden mit Hilfe des Agardilutionstests bestimmt, die geometrischen Mittel der Einzelwerte berechnet und verglichen (vgl. Tabellen Nr. 15-18).

Erwartungsgemäß fielen die MHK-Werte für Penicillin von 512 bzw. 256 $\mu\text{g/ml}$ bei den β -laktamaseproduzierenden Stämmen auf Werte zwischen 2 und 4 $\mu\text{g/ml}$ für die β -laktamase-negativen Varianten ab.

Percival et al. stellten in ihren Untersuchungen vergleichbare Werte für Penicillin bei einem Inoculum von 10^4 Keimen/μ fest (Percival et al., 1976).

Für Ceftizoxim wichen die MHK-Werte mit und ohne Plasmid höchstens um eine Titerstufe nach unten oder oben ab, was jedoch in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse begründet ist.

Für den Stamm 5729/83 blieben die Werte für Ceftizoxim mit und ohne Plasmid gleich bei 0,016 μg/ml.

Die Empfindlichkeit von Gonokokken gegenüber Ceftizoxim scheint somit nicht von der Anwesenheit eines Plasmids, sondern von Faktoren, die allgemein die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika bedingen, wie etwa veränderte Proteine der äußeren Zellmembran in Molekulargewicht und Menge oder auch geänderte Kreuzvernetzung der Peptidoglykane der Zellwand beeinflußt zu werden. Die Plasmide und damit die β-Laktamase üben kaum einen Einfluß auf Ceftizoxim aus; die Hydrolyse von Ceftizoxim durch die TEM-β-Laktamase der Gonokokken ist nahezu nicht möglich. (Relative Hydrolyserate von Ceftizoxim gegenüber Cephaloridin = 0:100) (Neu, 1982).

Für Cephalothin und Cefazolin, beides Vertreter der sogenannten "ersten Generation" der Cephalosporine (Dunn, 1982), konnten Abweichungen der MHK-Werte mit und ohne Plasmid für bestimmte Stämme festgestellt werden:

Bei dem Stamm 5719/83 sank der MHK-Wert für Cephalothin um 2 Titerstufen von 16 auf 4 μg/ml und für Cefazolin von 8 auf 2 μg/ml.

Auch bei dem Stamm 160/83 sank die Sensibilität gegenüber Cefazolin von 8 μg/ml mit Plasmid auf 2 μg/ml ohne Plasmid ab.

Bei den Stämmen 1327/83 und 9120/83 traten keine erheblichen Unterschiede bei den MHK-Werten für Cefazolin

und Cephalothin mit und ohne Plasmid auf.

Percival et al. kamen in ihren Empfindlichkeitsuntersuchungen von penicillinaseproduzierenden Gonokokkenstämmen und den daraus abgeleiteten penicillinasenegativen Varianten auf vergleichbare Ergebnisse (Percival et al., 1976): Sie stellten fest, daß bei einem Inoculum von 10^4 Keimen pro μ l die MHK-Werte für Cephaloridin, ebenfalls einem Vertreter der "ersten Generation" der Cephalosporine (Dunn, 1982), von $10\mu\text{g/ml}$ bei den plasmidtragenden Gonokokken auf $5\mu\text{g/ml}$ bei den β -laktamasenegativen Mutanten, bei einem Inoculum von 10^7 Keimen pro μ l, sogar von $50\mu\text{g/ml}$ auf $10\mu\text{g/ml}$ abfielen.

Diese Unterschiede sind unter Umständen dadurch zu erklären, daß bei den Stämmen, die β -Laktamase produzieren, ein gewisser Teil der zugesetzten Mengen an Cefazolin und Cephalothin hydrolysiert wird.

Gegenüber Ceftizoxim sind die Vertreter der "ersten Generation" der Cephalosporine nicht so β -laktamasefest, jedoch verglichen mit Ampicillin sehr stabil.

Die Hydrolyserate von Ampicillin gegenüber Cefazolin oder Cephalothin beträgt 100 : 1 (Neu, 1982).

Verliert nun ein Stamm die Fähigkeit zur β -Laktamasebildung, so werden die Antibiotika nicht mehr in höherem Ausmaß gespalten, das heißt, die für die Hemmung des Wachstums benötigte Menge an Chemotherapeutikum reduziert sich um den hydrolysierten Betrag, was eine Verkleinerung der minimalen Hemmkonzentration bedeutet.

6. Zusammenfassung

Seit die Gonorrhoe nicht mehr generell der Penicillintherapie zugänglich ist, mußten Behandlungsalternativen geprüft werden. Anfangs wurden Spectinomycin und auch Cefuroxim erfolgreich eingesetzt (Percival et al., 1976).

Neuerdings scheinen sich die Cephalosprine der neuen Generation, besonders Cefprozid, mit einer hohen in vitro Aktivität gegenüber Gonokokken (Korting, 1984) in besonderem Maße zu behaupten.

Bevor jedoch ein Antibiotikum in großem Umfang in die Therapie einer Krankheit eingeführt wird, müssen die Eigenschaften und Auswirkungen des Chemotherapeutikums auf die Gesamtpopulation der Zielspezies möglichst umfassend geprüft werden. Dazu gehört es auch, die Auswirkungen des Antibiotikums auf die Anwesenheit und Stabilität von Resistenz-Plasmiden zu erforschen.

Hierzu wurden 6 verschiedene β -laktamasebildende, plasmidtragende Gonokokkenstämme 30 Tage lang in Anwesenheit von Cefprozid in subinhibitorischen Dosen im flüssigen Medium passagiert. Täglich wurden Proben auf Platten subkultiviert und dem Test mit chromogenem Cephalosporin (O'Callaghan et al., 1972) unterzogen.

Nach Ablauf der Versuchszeit wurden von jedem Stamm je 100 morphologisch möglichst unterschiedliche Einzelkolonien ausgewählt und mit Nitrocefin getestet.

Hierbei ergab sich, daß je nach Stamm bis zu 3% der untersuchten Gonokokken unter dem Einfluß von Cefprozid ihr Plasmid abgaben.

Bei parallel dazu durchgeführten Versuchen mit Passagierung ohne Antibiotikum konnten nahezu keine Plasmidabgaben bei den identischen Ausgangsstämmen beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, daß Cefprozid Einfluß auf die

Stabilität, beziehungsweise auf die Häufigkeit der Abgabe der Plasmide auszuüben vermag, was bedeutet, daß mit der breiten Anwendung von Ceftizoxim in der Therapie der Gonorrhoe ein Rückgang der Resistenzplasmide bei *Neisseria gonorrhoeae* zu erwarten wäre.

Weiterhin wurden die Auswirkungen des Plasmidverlustes bei Gonokokken auf die Antibiotikaempfindlichkeit geprüft. Hierzu wurden Gonokokkenstämme einer Empfindlichkeitsprüfung mittels Agar-Dilutionstest (Korting, 1984) unterzogen. Traten bei der Passagierung in Bouillon β -laktamasenegative Mutanten auf, so wurden diese erneut dem Agar-Dilutionstest zugeführt und die Werte für die minimale Hemmkonzentration von Ausgangsstamm und der zugehörigen penicillinasenegativen Variante verglichen.

Während die Werte für Penicillin von 512 $\mu\text{g/ml}$ für β -laktamasebildende Gonokokken auf Werte von 2-4 $\mu\text{g/ml}$ bei plasmidfreien Gonokokkenstämmen abfielen, zeigten sich keine Veränderungen der MHK-Werte für Ceftizoxim.

β -Laktamasebildner und zugehörige plasmidnegative Varianten wiesen in etwa gleiche MHK-Werte von 0,016 oder 0,008 $\mu\text{g/ml}$ auf.

Bei den Vertretern der sogenannten "ersten Generation" der Cephalosporine (Neu, 1982) konnte ein geringes Abfallen der MHK-Werte bei bestimmten Gonokokkenstämmen festgestellt werden. So sanken die Werte für Cephalothin und Cefazolin bei dem Stamm 5729/83 um jeweils 2 Titerstufen von 16 auf 4 $\mu\text{g/ml}$ bei Cephalothin, von 8 auf 2 $\mu\text{g/ml}$ bei Cefazolin. Beim Stamm 160/83 fiel der Wert für Cefazolin ebenfalls um 2 Titerstufen, für Cephalothin um 1 Titerstufe, während beim Stamm 1327/83 sowie 9120/83 die Werte mit und ohne Plasmid gleich blieben.

Die hohe in vitro Aktivität von Ceftizoxim gegenüber Gonokokken (Korting, 1984) konnte auch in der hier durchgeführten Empfindlichkeitsbestimmung bestätigt werden.

Die positive Eigenschaft auf die Stabilität der Plasmide in Gonokokken wie auch die große β -Laktamasestabilität (Neu, 1982), besonders aber die hohe in vivo Wirksamkeit gegenüber Gonokokken (Korting und Neubert, 1984), lassen Ceftizoxim eine besondere Stellung in der Therapie der insbesondere von penicillinasebildenden Gonokokken verursachten Gonorrhoe einnehmen.

7. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1 :	Aufstellung der β -laktamasebildenden Gonokokkenstämme
Tabelle 2 :	Antibiotika und zugehörige Korrekturfaktoren zur Gewichtsbestimmung
Tabelle 3 :	MHK-Werte der eingesetzten Stämme für Cefizoxim aus dem Vorversuch (Agardilutionstest)
Tabelle 4 :	MHK-Werte der eingesetzten Stämme für Penicillin aus dem Vorversuch (Agardilutionstest)
Tabelle 5 :	MHK-Werte der eingesetzten Stämme für Cefizoxim aus dem Vorversuch (Bouillon-Verdünnungstest)
Tabelle 6 :	MHK-Werte der eingesetzten Stämme für Penicillin aus dem Vorversuch (Bouillon-Verdünnungstest)
Tabelle 7 :	Häufigkeit der Plasmidverluste während der Passagierung in der Cefizoximkonzentration von 0,002 μ g/ml
Tabelle 8 :	Häufigkeit der Plasmidverluste während der Passagierung in der Cefizoximkonzentration von 0,000125 μ g/ml
Tabelle 9 :	Häufigkeit der Plasmidverluste während der Passagierung ohne Antibiotikum
Tabelle 10:	MHK-Werte der eingesetzten Gonokokkenstämme nach Abschluß des Hauptversuchs für Penicillin, Cefizoxim, Cefazolin und Cephalothin
Tabelle 11:	MHK-Werte für die WHO-Stämme III, V u. VII

- Tabelle 12: MHK-Werte für den bei Passagierung ohne Antibiotikum gefundenen β -laktamasen-negativen Stamm
- Tabelle 13: MHK-Werte für die unter dem Einfluß von Ceftizoxim in der Konzentration von 0,002 $\mu\text{g/ml}$ gefundenen plasmidfreien Kolonien
- Tabelle 14: MHK-Werte für die unter dem Einfluß von Ceftizoxim in der Konzentration von 0,00012 $\mu\text{g/ml}$ gefundenen plasmidfreien Kolonien
- Tabelle 15: Empfindlichkeiten gegenüber Ceftizoxim von plasmidtragenden Stämmen und den davon abgeleiteten plasmidfreien Varianten (geometrische Mittelwerte)
- Tabelle 16: Empfindlichkeiten gegenüber Penicillin von plasmidtragenden Stämmen und den davon abgeleiteten plasmidfreien Varianten (geometrische Mittelwerte)
- Tabelle 17: Empfindlichkeiten gegenüber Cephalothin von plasmidtragenden Stämmen und den davon abgeleiteten plasmidfreien Varianten (geometrische Mittelwerte)
- Tabelle 18: Empfindlichkeiten gegenüber Cefazolin von plasmidtragenden Stämmen und den davon abgeleiteten plasmidfreien Varianten (geometrische Mittelwerte)

8. Literaturverzeichnis

Ashford, W. A., Golash, R. G., Hemming, V. G., Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*, Lancet II : 657 -658 (1976)

Barry, A. L., Jones, R. N., Thornsberry, C., et al., Ceftizoxime: collaborative multiphases in vitro evaluation including tentative interpretive standarts for disk susceptibility tests, β -lactamase stability, and inhibition, J. Antimicrob. Chemother. Supplement C to Volume 10: 25-45 (1982)

Blog, F. B., Chang, A., De Koning, G. A. J., Oranje, H. P., Stolz, E., Penicillinase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Rotterdam, Brit. J. Vener. Dis. 53: 98-100 (1977)

Brown, St., Warnnisson, T., Biddle, J., Panikabutra, K., Traisupa, A., Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Bangkok: Is singledrug treatment passé ?, Lancet II: 1366-1368 (1982)

O'Callaghan, H. C., Morris, A., Kirby, S. M., Shingler, A. H., Novel Method for Detection of β -Lactamase by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrat, Antimicrob. Agents and Chemother. 1: 283-288 (1972)

Carifo, K. B., Catlin, B. W., *Neisserio gonorrhoeae* auxotyping: differentiation of clinical isolates based on growth responses on chemically defined media, Appl. Microbiol. 26: 223-230 (1973)

Chow, A. W., Finegold, S. M., In vitro activity of ceftizoxime against anaerobic bacteria an comparison with other cephalosporins, J. Antimicrob. Chemother. 10: 45-51 (1982)

Cutler, R. M., Blair, A. D., Burges, E. D., Parks, D., Pharmacokinetics of ceftizoxime, J. Antimicrob. Chemother. 10: 91-99 (1982)

- Dickgießer, N., β -Laktamase-positive *Neisseria gonorrhoeae*: Isoelektrofokussierung der β -Laktamasen und Plasmidnachweis im Agarosegel, *Akt. Dermatol.* 9: 179-183 (1983)
- Dunn, G.L., Cefprozime and other third-generation cephalosporins: structure-activity relationships, *J. Antimicrob. Chemother.* 10: 1-11 (1982)
- Dillon, J.A.R., Duck, P., Thomas, D.Y., Molecular and phenotypic characterization of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* from Canadian sources, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 19: 952-957 (1981)
- Eichmann, A., Piffaretti, J.-C., Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in Zürich, Switzerland, *Br. J. Vener. Dis.* 60: 147-150 (1984)
- Elwell, L.P., Roberts, M., Falkow, S., Plasmid-mediated β -lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 11: 528-533 (1977)
- Engel, A., *Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik*, Bd. 1, Stuttgart (Klett), 1973
- Van Embden, J.D.A., van Klingeren, B., Dessens-Kroon, M., Wijngaarden, L.J., Penicillin-producing *Neisseria gonorrhoeae* in the Netherlands, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 18: 789-797 (1980)
- Van Embden, J.D.A., van Klingeren, B., van Wijngaarden, L.J., Dessens-Kroon, M., Penicillinase-producing gonococci in the Netherlands, *J. Antimicrob. Chemother.* 11: 15 (1983)
- Van Embden, J.D.A., van Klingeren, B., Dessens-Kroon, M., van Wijngaarden, L.J., Emergence in the Netherlands of penicillinase-producing *Gonococci* carrying "Africa" Plasmid in combination with transfer Plasmid, *Lancet* 1;2: 938 (1981)

Hafiz, S., Mc Entegart, M.G., Prolonged survival of *Neisseria gonorrhoeae* in a new liquid medium, *Brit. J. Vener. Dis.* 52: 381-383 (1976)

Kirven, L.A., Thornsberry, C., Transfer of β -lactamase genes of *Neisseria gonorrhoeae* by conjugation, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 11: 1004-1006 (1977)

Korting, H.C., In vitro susceptibility of recent isolates of *Neisseria gonorrhoeae* to cephalosporins of different generations and Penicillin G: A comparative evaluation, *Dermatologica* 168: 67-72 (1984)

Korting, H.C., Abeck, D., The susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* strains to different cephalosporins and penicillin G depends on the auxo type, eingereicht zur Veröffentlichung in *Chemother.* 1985

Korting, H.C., Neubert, U., Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to Ceftizoxime in vitro and in vivo, *Chemother.* 30: 322-327 (1984)

Korting, H.C., Behrendt, H., Roth, K.-H., Neubert, U., Repeated Exposition to Subinhibitory Concentrations of Antibiotic in vitro Readily Decreases Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to Rifampicin, but Not to New Cephalosporins and Penicillin G, *Chemother.* 30: 366-372 (1984)

Lorian, V., Atkinson, B., Effects of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on Cross Walls of Cocci, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 9: 1043-1055 (1976)

Maness, M.J., Sparling, P.F., Multiple resistance due to a single mutation in *Neisseria gonorrhoeae*, *J. Infect. Dis.* 128: 98-100 (1973)

Neu, H.C., Factors that affect the in-vitro activity of cephalosporin antibiotics, *J. Antimicrob. Chemother.* 10: 11-25 (1982)

Osoba, A.O., Rotowa, N.A., Dgunbanjo, B.O., et al., Review of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Ibadan, Nigeria, and their susceptibility to antibiotics, *Eur. Sex. Transm. Dis.* 1: 145 -148 (1984)

Percival, A., Corkill, J.E., Arya, O.P., et al., Penicillinase-producing gonococci in Liverpool, *Lancet* II: 1379-1382 (1976)

Petzoldt, D., *Gonorrhoe*, in: *Dermatologie in Praxis und Klinik* IV, hrsg. von Korting, G.W., Stuttgart, New York, (Thieme) 1981, S. 44.3-44.16

Phillips, I., β -lactamase-producing, penicillinresistant gonococcus, *Lancet* II: 656-657 (1976)

Piot, P., van Dyck, E., et al., In vitro activity of cefotaxim and other cephalosporins against *Neisseria gonorrhoeae*, *J. Antimicrob. Chemother.* 6: 47-50 (1980)

Piot, P., β -lactamase-producing *Haemophil* and *Neisseria*, *Acta. Clin. Belg.* 33: 45-54 (1978)

Roberts, M., Elwell, L.P., Falkow, S., Molecular characterization of two β -lactamase-specifying plasmids isolated from *Neisseria gonorrhoeae*, *J. Bact.* 131: 557-563 (1977)

Roberts, M., Falkow, S., Conjugal transfer of R plasmids in *Neisseria gonorrhoeae*, *Nature* 266: 630-631 (1977)

Sparling, P.F., Holmes, K.K., Wiesner, P.J., Puzis, M., Summary of the Conference on the Problem of Penicillin-Resistant Gonococci, *J. Infect. Dis.* 135: 865-867 (1977)

Sachs, L., *Angewandte Statistik, Planung und Auswertung, Methoden und Modelle*, Berlin, Heidelberg, New York, 1981

Voß, H., Naber, K., Halospor, Cefotiam, ein parenterales Breit-spektrum-Cephalosporin, München (MMW Medizin Verlag) 1982

Herrn Prof. Dr. Otto Braun-Falco danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Dermatologischen Universitätsklinik München durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. H.C. Korting sowohl für die Anleitung und Betreuung als auch für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Weiter möchte ich allen Mitarbeitern des Bakteriologischen Labors der Dermatologischen Universitätsklinik München danken.

Lebenslauf

- 1961 am 14.März als zweites Kind des Zahnarztes
Dr. Herbert Unglaub und seiner Ehefrau
Melitta in Neukirchen b.Hl.Blut geboren
- 1967 Eintritt in die Volksschule Neukirchen b.Hl.Blut
- 1971 Übertritt an das neusprachliche Benedikt-Statt-
ler-Gymnasium Kötzing
- 1980 Abitur an dieser Schule,
Aufnahme des Studiums der Zahnheilkunde an der
Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 1983 Ablegung der zahnärztlichen Vorprüfung
- 1986 Staatsexamen

